取扱説明書

ReproFF2™

(フィーダーレス培養からの切り替えプロトコル)

Cat.# RCHEMD006

注意事項（必ずお読みください）

・継代時は Dispase をご使用下さい。
・P-1000 のピペットマンを用いたコロニーの細分化は行わないでください。
・ReproFF2™に移行後、一時的に細胞の状態が悪化する場合がありますが、4 継代ほど培養を続けると状態が安定しますので、しばらく培養を続けて下さい。
・細胞の状態は株によって異なりますので、未分化状態が良くない場合は、bFGF の濃度を 10～30 ng/mL にしていただくことで改善する場合がございます。
・フィーダーレス培養から ReproFF2™に移行後の培養スケジュールは以下のようになります（細胞株によって異なる場合がございます）。

	月	火	水	木	金	土	日
0 週目	FF2 へ	MC	MC	MC	継代 1		
1 週目	MC		MC		継代 2		
2 週目	MC		MC		継代 3		
3 週目	MC		MC		継代 4		

MC:培地交換

保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに-20℃で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は 2～8℃で保存して下さい。小分け保存する場合は、小分け後、-20℃で保存してください。解凍後は 2 週間を目安に使い切って下さい。なるべく凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

・月、水、金曜日の培養作業で未分化維持が可能です。

推奨プロトコル

・フィーダー細胞は不要です。
・ヒト iPS 細胞(Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007)でロット試験済みです。
・浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです。
・血清は不含です。
※本製品は 2-Mercaptoethanol を含みます。

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

使用方法

ReproFF2™を用いたヒト ES/iPS 細胞の継代方法

必要なもの

・本品：ReproFF2™に 5 ng/mL bFGF（RCHEOT002, 003）を添加したもの（以下、これらを「ReproFF2™」と総称する）。ヒト ES/iPS 細胞の培養には b FGF の添加が必要です。濃度はご使用の細胞株によって異なる場合がございます。
・Dispase (STEMCELL Technologies)
・Corning®マトリゲル ヒト ES 細胞最適化マトリックス（Corning)
・セルスクレーパー
・PBS (-)：Ca^{++}, Mg^{++}-free PBS
・60 mm 細胞培養ディッシュ
・P-1000 ピペットマンとチップ
・その他培養操作に通常必要なもの

剥離液と培地は室温で使用してください。
コーティング剤は 4℃で使用してください。

A：ディッシュのコーティング方法
・A：マトリゲルによるコーティング
<マトリゲルの分注>
A1、マトリゲルを冷蔵庫で一晩かけて解凍します。泡立たせないようにボトルを回して撹拌します。温度が上がるとゲル化するので注意して下さい。
A2、15 mL チューブとチップを十分に冷やしておきます。
A3、操作 A2 で解凍したマトリゲルをゲル化させないように氷上で、15 mL チューブに 400 μL ずつ分注します。
A4、パラフィルムでシールし、-80℃で保存します。

<コーティング>
A5、分注したチューブを冷蔵庫で一晩かけて解凍します。
A6、粘性はあるがゲル状のものが見えないことを確認し、DMEM 等の基礎培地（血清不含）を 11.6 mL 加え 30 倍希釈します。泡立てないようにゆっくりピペッティングします。
A7、30 倍希釈したマトリゲルを 60 mm 細胞培養ディッシュに 2 mL 加え、ピペットマンで全体に行き渡らせます。
A8、パラフィルム等でシールし、室温で 3 時間程静置します。すぐに使用しない場合はそのまま 4℃で保存できます。

B：フィーダーレス培養 から ReproFF2™培養への切り替え方法
（以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です）
B1、あらかじめ操作 A でコーティングしたディッシュからコーティング液を取り除き、ReproFF2™を 2 mL 加えておきます。
B2、フィーダーレスで培養しているヒト ES/iPS 細胞（60 mm ディッシュ）から培地を除き、PBS(-) 2 mL で細胞を洗います。
B3、PBS(-)を除去し、Dispase (2U/mL) 2 mL をディッシュに加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2インキュベーターで 10 分程加温します。加温時間はご使用の細胞株、細胞の状態によって異なる場合があります。
B4、細胞の状態を顕微鏡で観察し、半分以上のコロニーがディッシュから剥がれかけている状態になっている事を確認します。
B5、Dispase を除去し、PBS(-) 4 mL で細胞を洗います。
B6、PBS (-)を除去し、再度 PBS(-) 4 mL で細胞を洗います。
B7、PBS (-)を除去し、ReproFF2™を 3 mL ディッシュに加え、セルスクレーパーを用いてコロニー剥がし、5 mL ディスポーザブルピペットを使って 15 mL 遠心チューブに回収します。
B8、ReproFF2™をディッシュに 3 mL 加え、ディッシュに残った細胞を回収します。

B9、室温、100 x g で 2 分間遠心します。
B10、上清をできるだけ取り除き、新しい ReproFF2™を 4 mL 加えます。**細胞を懸濁するために 5 mL ディスポーザブルのピペットで 1 回だけピペッティングしてください。2 回以上ピペッティング行うとコロニーが小さくなり過ぎ、うまく培養できないことがあります。**
B11、操作 B10 で得られた細胞懸濁液 2 mL を操作 B1 で準備したディッシュに播種してください。
B12、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、CO_2 インキュベーターで培養します。
B13、ReproFF2™に移行後、以下のスケジュールにしたがって培養を行って下さい。移行直後、次の継代までは毎日培地交換を行ってください。

	月	火	水	木	金	土	日
0 週目	FF2 へ	MC	MC	MC	継代 1		
1 週目	MC		MC		継代 2		
2 週目	MC		MC		継代 3		
3 週目	MC		MC		継代 4		

継代 1：コロニーが 1～2mm 程度の大きさになっていますので継代を行って下さい。
MC；培地交換

C：フィーダーレス培養（ReproFF2™)の継代方法

C1、あらかじめ操作 A でコーティングしたディッシュからコーティング液を取り除き、ReproFF2™を 2 mL 加えておきます。
C2、ReproFF2™でフィーダーレス培養中のディッシュから ReproFF2™を除き、PBS(-) 2 mL で細胞を洗います。
C3、PBS(-)を除去し、Dispase (2U/mL) 2 mL をディッシュに加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2 インキュベーターで 10 分程加温します。加温時間はご使用の細胞株、細胞の状態によって異なる場合があります。
C4、細胞の状態を顕微鏡で観察し、半分以上のコロニーがディッシュから剥がれかけている状態になっている事を確認します。
C5、Dispase を除去し、PBS(-) 4 mL で細胞を洗います。
C6、PBS (-)を除去し、再度 PBS(-) 4 mL で細胞を洗います。
C7、PBS (-)を除去し、ReproFF2™を 3 mL ディッシュに加え、セルスクレーパーを用いてコロニー剥がし、5 mL ディスポーザブルピペットを使って 15 mL 遠心チューブに回収します。
C8、ReproFF2™をディッシュに 3 mL 加え、ディッシュに残った細胞を回収します。
C9、室温、100 x g で 2 分間遠心します。
C10、上清をできるだけ取り除き、新しい ReproFF2™を 4 mL 加えます。**細胞を懸濁するために 5 mL ディスポーザブルのピペットで 1 回だけピペッティングしてください。2 回以上ピペッティング行うとコロニーが小さくなり過ぎ、うまく培養できないことがあります。**
C11、操作 C10 で得られた細胞懸濁液 2 mL を操作 C1 で準備したディッシュに播種してください。ReproFF2™ 培養へ移行後 4 継代目までは 1:2 の希釈率で継代してください。培養が安定した後は 1:3～1:4 の希釈率での継代が可能です。
C12、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、5%CO_2 インキュベーターで一晩培養します。
C13、月曜日、水曜日に培地交換を行います。

関連製品

RCHEMD001	Primate ES Cell medium
RCHEMD003, 004	ReproFF™
RCHEMD005	ReproStem™
RCHEMD007	ReproXF™
RCHETP002	Dissociation Solution for human ES/iPS Cells
RCHEFM001	Freezing Medium for human ES/iPS Cells
RCHEOT001	ReproCoat™
RCHEOT002, 003	bFGF
RCHEOT004	Lamimin-5
RCHEFC001	Feeder Cells（SL10）
RCHEFC003	Feeder Cells (MEF)

株式会社リプロセル
https://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com